



Patent
Attorney Docket No. 60711.000025

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application Number : 10/698,402 Confirmation No. 2689
Applicants : Jean-Louis ESCARY
Filed : November 3, 2003
Title : POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α -5
GENE
TC/Art Unit : 1647
Examiner: : Jegatheesan SEHARASEYON
Docket No. : 60711.000025
Customer No. : 21967

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

MAIL STOP AMENDMENT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Applicant respectfully submits the certified copy of French Patent Application No. 01/05919, filed May 3, 2001, in connection with the above-identified patent application. Applicant claims priority benefits under 35 U.S.C. § 365(b) from this French Application in the above identified Application filed on November 3, 2003.

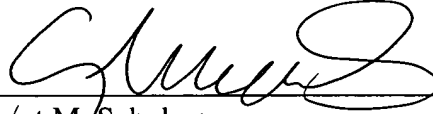
No fee is believed due as a result of this submission. However, if a fee is due upon the filing of this priority document, please charge such fee to the undersigned's Deposit Account No. 50-0206.

Respectfully submitted,

HUNTON & WILLIAMS LLP

March 29, 2005

By:


Robert M. Schulman
Registration No. 31,196

Christopher J. Nichols, Ph.D.
Registration No. 55,984

HUNTON & WILLIAMS LLP
Intellectual Property Department
1900 K Street, N.W., Suite 1200
Washington, DC 20006-1109
(202) 955-1500 (telephone)
(202) 778-2201 (facsimile)

RMS/CJN:cdh

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 19 JAN. 2006

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REMISE DES PIÈCES DATE 3 MAI 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0105919 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 03 MAI 2001		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE RINUY, SANTARELLI 14, avenue de la Grande Armée 75017 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BIF022984/FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveaux polynucléotides et polypeptides de l'IFN alpha 5.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Adresse Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» GenOdyssee Société Anonyme _____ _____ Parc d'Affaires Technopolis, 3 avenue du Canada, Bat Alpha, B.P. 810, LES ULIS 91974 COURTABOEUF FRANCE FRANÇAISE	

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2



REMISE DES PIÈCES DATE 3 MAI 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0105919 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 190600
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		BIF022984/FR	
6 MANDATAIRE Nom Prénom Cabinet ou Société N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		RINUY, SANTARELLI 14 AVENUE DE LA GRANDE ARMEE 75017 PARIS 01 40 55 43 43	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET	
 Thierry CAEN N°98.0600 RINUY, SANTARELLI			

5 La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comportant des polymorphismes de type SNP dans la séquence nucléotidique du gène IFN α -5, de nouveaux polypeptides ainsi que leurs utilisations thérapeutiques.

10 ART ANTERIEUR

 Le gène interféron alpha 5 (IFN α -5) est décrit dans la publication de K. Henco et collaborateurs; "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes"; J. Mol. Biol.; 185 (2); 227-260; (1985).

15 La séquence nucléotidique de ce gène est accessible sous le numéro d'accès X02956 dans la base de données GenBank.

 Les interférons alpha humains (IFN α) sont connus pour leurs effets anti-prolifératifs cellulaires et leurs implications dans les réponses anti-virales et anti-parasitaires.

20 Les IFN α sont aussi connus pour inhiber l'expression de plusieurs autres cytokines au niveau des cellules hématopoïétiques souches, ainsi que pour inhiber la prolifération cellulaire de certaines tumeurs.

 Les IFN α sont également connus pour réduire l'expression des récepteurs de l'EGF dans les carcinomes rénaux, pour inhiber l'expression de certains gènes mitochondriaux, pour inhiber la prolifération des fibroblastes, des
25 monocytes et des lymphocytes B et pour bloquer la synthèse des anticorps par les lymphocytes B.

 Les IFN α sont également connus pour induire l'expression d'antigènes spécifiques de tumeurs à la surface de cellules tumorales et également pour induire la transcription des gènes placés sous le contrôle de
30 régions promotrices de type ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) en agissant sur les facteurs de transcription spécifiques de ces ISRE.

Il a été observé par ailleurs une immunisation dirigée contre les $\text{INF}\alpha$ chez des patients atteints de certaines formes de pathologies auto-immunes ou d'infections virales généralisées ainsi que dans certains cancers.

Il est connu que les $\text{INF}\alpha$ sont impliqués dans différents
5 dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire
10 comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en
15 particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Les $\text{INF}\alpha$ sont particulièrement utilisés pour le traitement des
20 hépatites chroniques B et C, des leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, des myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, de tumeurs carcinoïdes, de mélanomes malins, de carcinomes rénaux métastasés ainsi que des tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du
25 SIDA.

Les $\text{INF}\alpha$ sont reconnus par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des verrues génitales ou vénériennes.

Toutefois, les $\text{INF}\alpha$ présentent de nombreux effets secondaires lorsqu'ils sont employés dans des compositions pharmaceutiques, tels que des
30 réactions d'hypersensibilité aiguë (urticaire, broncho-constriction, choc anaphylactique, etc.), des arythmies cardiaques, des hypotensions artérielles,

des crises d'épilepsie, des troubles des fonctions thyroïdiennes ou des syndromes pseudo-grippaux (fièvres, sueurs, myalgies).

La demanderesse a trouvé de nouveaux polypeptides et nouveaux polynucléotides analogues à l'IFN α -5, pouvant avoir une fonctionnalité
5 différente de l'IFN α -5 naturel.

Ces nouveaux polypeptides et polynucléotides peuvent notamment être utilisés pour traiter ou prévenir les dérèglements ou maladies mentionnés précédemment et éviter tout ou partie des inconvénients qui leurs sont liés.

10

L'INVENTION

L'invention a pour premier objet de nouveaux polynucléotides qui diffèrent de la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'IFN α -5, en ce qu'ils comportent un ou plusieurs polymorphismes de type SNP (Single
15 Nucleotide Polymorphism) fonctionnels.

La séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène IFN α -5 humain sauvage de référence est composée de 1475 nucléotides et comporte une séquence codante de 570 nucléotides, du nucléotide 434 (codon start) au nucléotide 1003 (codon stop).

20 La demanderesse a identifié deux polymorphismes de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'IFN α -5.

Ces deux polymorphismes sont présentés ci-dessous :

1) Le nucléotide cytosine (c) en position 641 de la séquence
25 nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence IFN α -5 est muté en guanine (g). Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après c641g.

2) Le nucléotide guanine (g) en position 798 de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence IFN α -5 est muté en cytosine (c). Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après g798c.

30 Ces polymorphismes de type SNP fonctionnel (au sens de la présente invention) ont été chacun identifiés par la demanderesse sur la base

du procédé de détermination décrit dans sa demande de brevet FR 00 22894, intitulée "Procédé de détermination d'un ou plusieurs polymorphisme(s) fonctionnel(s) dans la séquence nucléotidique d'un gène candidat fonctionnel présélectionné et ses applications" et déposée le 6 décembre 2000, citée ici à
5 titre de référence.

Le procédé décrit dans cette demande de brevet permet l'identification d'un (ou plusieurs) polymorphisme(s) de type SNP fonctionnel(s) préexistant(s) dans au moins un individu constitutif d'une population aléatoire d'individus.

10 Dans le cadre de la présente invention, un fragment de la séquence nucléotidique du gène IFN α -5, comprenant la séquence codante, a été isolé chez des individus dans une population d'individus choisis de manière aléatoire.

Un séquençage de ces fragments a ensuite été réalisé sur
15 certains de ces échantillons présentant un profil hétéroduplex (différent de la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'IFN α -5) après analyse par DHPLC ("Denaturing-High Performance Liquid Chromatography"; Chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante).

On a alors comparé le fragment ainsi séquencé à la séquence
20 nucléotidique du fragment du gène IFN α -5 sauvage de référence et identifier les polymorphismes de type SNP c641g et g798c.

Ainsi ces polymorphismes de type SNP fonctionnels sont naturels et chacun d'entre eux est présent chez certains individus de la population mondiale.

25 Le gène IFN α -5 sauvage de référence code pour une protéine immature de 189 acides aminés, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, qui sera convertit en protéine mature de 166 acides aminés, par clivage du peptide signal qui comprend les 23 premiers acides aminés.

Chacun des polymorphismes de type SNP de l'invention c641g et
30 g798c entraînent des modifications de la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène IFN α -5 au niveau de la séquence d'acides aminés.

Ces modifications dans la séquence d'acides aminés sont les suivantes :

1) Le polymorphisme de type SNP c641g entraîne une mutation de l'acide aminé glutamine (Q) en position 70 dans la protéine immature du
5 gène IFN α -5, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en acide glutamique (E) et en position 47 de la protéine mature.

Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment Q47E et Q70E la mutation codée par le polymorphisme de type
10 SNP de l'invention selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature ou à la protéine immature.

2) Le polymorphisme de type SNP g798c entraîne une mutation de l'acide aminé cystéine (C) en position 122 dans la protéine immature du
gène IFN α -5, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en sérine (S) et en position 99 de la protéine mature.

15 Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment C122S et C99S la mutation codée par le polymorphisme de type SNP de l'invention selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature ou à la protéine immature.

Les polymorphismes de type SNP de l'invention entraînent des
20 modifications de la conformation spatiale des polypeptides conformes à l'invention par rapport au polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence IFN α -5.

Ces modifications peuvent être observées par modélisation moléculaire bio-informatique, selon des méthodes bien connues de l'homme du
25 métier mettant en œuvre, par exemple, les outils de modélisation *de novo* (par exemple, SEQFOLD/MSI), d'homologie (par exemple, MODELER/MSI), de minimisation des champs de force (par exemple, DISCOVER, DELPHI/MSI) et/ou de dynamique moléculaire (par exemple, CFF/MSI).

Des exemples de telles modélisations sont donnés ci-après dans
30 la partie expérimentale.

1) La modélisation bio-informatique permet d'observer que la mutation Q47E sur la protéine mutée mature entraîne un dépliage de la partie C-terminale de la boucle dite "AB" qui est connue pour être impliquée dans la liaison de IFN α -5 avec son récepteur.

5 Le résidu Glu47 semble jouer un rôle important dans la formation de cette boucle puisqu'il est conservée dans tous les interférons.

La modélisation bio-informatique permet ainsi de prévoir que la présence de l'acide aminé acide glutamique en position 47 entraîne une modification significative de la structure et de la fonction de la protéine IFN α -5
10 naturel.

2) La modélisation bio-informatique permet d'observer que la mutation C99S sur la protéine mutée mature entraîne la disparition d'un pont disulfure qui participe dans la protéine IFN α -5 naturel à la conformation tridimensionnelle de la partie N-terminale et de la boucle dite "CD", entre les
15 hélices C et D.

La mutation C99S rend mobile la boucle N-terminale (Cys1-Thr6). La fin de l'hélice C s'en trouve dépliée et la boucle "CD" fortement perturbée.

Par ailleurs, il est connu que ce pont disulfure est conservé dans tous les interférons alpha et bêta. La mutation C99S doit donc affecter la liaison
20 de la protéine IFN α -5 mutée à son récepteur.

La modélisation bio-informatique permet ainsi de prévoir que la présence de l'acide aminé sérine en position 99 entraîne une modification significative de la structure et de la fonction de la protéine IFN α -5 naturel.

Un génotypage des polynucléotides conformes à l'invention peut également être effectué de façon à déterminer la fréquence allélique de ces
25 polynucléotides dans une population. Un exemple de génotypage est donné, ci-après, dans la partie expérimentale.

La détermination de la fonctionnalité des polypeptides de l'invention peut également être effectuée par un test de leur activité biologique.

A cet égard, on peut, par exemple, mesurer l'effet anti-prolifératif sur la lignée cellulaire de Daudi de polypeptides conformes à l'invention en comparaison avec la protéine IFN α -5 naturel.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de polynucléotides et de
5 polypeptides conformes à l'invention ainsi que de molécules thérapeutiques obtenues et/ou identifiées à partir de ces polynucléotides et polypeptide, notamment pour la prévention et le traitement de certains dérèglements et/ou maladies humaines.

La Figure 1 représente la modélisation de la protéine codée
10 conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP Q47E et de la protéine IFN α -5 naturel.

La Figure 2 représente la modélisation de la partie supérieure de chacune des protéines représentées sur la Figure 1.

Le ruban noir des Figures 1 et 2 représente la structure de la
15 protéine l'IFN α -5 naturel.

Le ruban blanc des Figures 1 et 2 représente la structure de la protéine l'IFN α -5 mutée (Q47E).

La Figure 3 représente la modélisation de la protéine codée conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP C99S et de la
20 protéine l'IFN α -5 naturel.

La Figure 4 représente la modélisation de la partie supérieure de chacune des protéines représentées sur la Figure 3.

Le ruban noir des Figures 3 et 4 représente la structure de la protéine l'IFN α -5 naturel.

25 Le ruban blanc des Figures 3 et 4 représente la structure de la protéine l'IFN α -5 mutée (C99S).

La Figure 5 représente le résultat du génotypage du polymorphisme de type SNP c641g dans une population d'individus.

Sur cette figure, les abscisses représentent la valeur mp du filtre
30 Tamra (ddGTP) et les ordonnées représentent la valeur mp du filtre R-110 (ddCTP).

En haut à droite, le groupe hétérozygote CG contient 6 individus.

En haut à gauche, le groupe homozygote CC contient 227 individus.

En bas à gauche, le groupe d'individus contient 7 blancs et 6
5 individus non génotypés.

La Figure 6 représente le résultat du génotypage du polymorphisme de type SNP g798c dans une population d'individus.

Sur cette figure, les abscisses représentent la valeur mp du filtre Tamra (ddCTP) et les ordonnées représentent la valeur mp du filtre R-110
10 (ddGTP).

En haut à droite, le groupe hétérozygote CG contient 4 individus.

En bas à droite, le groupe homozygote CC contient 234 individus.

En bas à gauche, le groupe d'individus contient 7 blancs et 1
individu non génotypé.

15

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Définitions

On entend par "séquence nucléotidique du gène sauvage de référence", la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 du gène IFN α -5 humain.

20 Cette séquence est accessible dans la GenBank sous le numéro d'accès X02956 et décrite dans la publication de K. Henco et collaborateurs; "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes"; J. Mol. Biol.; 185 (2); 227-260; (1985).

On entend par "IFN α -5 naturel" la protéine mature codée par la
25 séquence nucléotidique du gène sauvage de référence. La protéine immature de l'IFN α -5 naturel correspond à la séquence peptidique ID SEQ N°2.

On entend par "polynucléotide", un polyribonucléotide ou un polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

Le terme polynucléotide inclut, par exemple, un ADN simple brin
30 ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins, un ARN simple brin ou

double brin et un ARN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins. Le terme polynucléotide peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs régions triple brins. On entend également par polynucléotide les ADNs et ARNs
5 contenant une ou plusieurs bases modifiées de façon à avoir un squelette modifié pour la stabilité ou pour d'autres raisons. On entend par base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles que l'inosine.

On entend par "polypeptide", un peptide, un oligopeptide, un oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un
10 à l'autre par une liaison peptidique normale ou modifiée, comme dans le cas des peptides isostères, par exemple.

Un polypeptide peut être composé d'autres acides aminés que les
20 acides aminés codés par les gènes humains. Un polypeptide peut également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels, tel que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés
15 chimiques, qui sont bien connus de l'homme du métier. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature. Ces modifications peuvent apparaître n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

20 Un polypeptide peut être ramifié suite à une ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-translation naturel ou synthétique, qui sont bien connus de l'homme du métier.

On entend, par exemple, par modifications d'un polypeptide,
25 l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente ou non-covalente, la cyclisation, la formation de pont disulfure, la
30 déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au

GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la sénéoylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés telle que l'arginylation ou l'ubiquitination. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature :

- 5 PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182 :626-646 et Rattan et al. "Protein
10 Synthesis : Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663 :48-62.

On entend par "polynucléotide isolé" ou "polypeptide isolé" un polynucléotide ou un polypeptide tel que défini précédemment qui est isolé du corps humain ou autrement produit par un procédé technique.

- 15 On entend par "identité", la mesure d'identité d'une séquence nucléotidique ou polypeptidique.

L'identité est un terme bien connu de l'homme du métier et de la littérature. Voir COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS
20 AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994; et SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987.

Les méthodes communément employées pour déterminer
25 l'identité et la similarité entre deux séquences sont également bien décrites dans la littérature. Voir GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, et Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48 :1073.

Un polynucléotide ayant, par exemple, une identité d'au moins
30 95 % avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 est un polynucléotide qui

comporte au plus 5 points de mutation sur 100 nucléotides, par rapport à ladite séquence.

Ces points de mutation peuvent être une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s) et/ou délétion(s) d'un (ou plusieurs) nucléotide(s).

5 De même, un polypeptide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95 % avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 est un polypeptide qui comporte au plus 5 points de mutation sur 100 acides aminés, par rapport à ladite séquence.

10 Ces points de mutation peuvent être une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s) et/ou délétion(s) d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s).

Les polynucléotides et les polypeptides conformes à l'invention qui ne sont pas totalement identique avec respectivement la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 ou la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, étant
15 entendu que ces séquences comportent au moins l'un des polymorphismes de type SNP de l'invention, sont considérés comme des variants de ces séquences.

Habituellement un polynucléotide conforme à l'invention possède la même, ou pratiquement la même activité biologique que la séquence
20 nucléotidique ID SEQ N°1 comportant au moins l'un des polymorphismes de type SNP de l'invention.

De même, habituellement un polypeptide conforme à l'invention possède la même, ou pratiquement la même activité biologique que la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 comportant au moins l'un des
25 polymorphismes de type SNP de l'invention.

Un variant, selon l'invention, peut être obtenu, par exemple, par mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

On entend par "polymorphisme de type SNP", toute variation naturelle d'une base dans une séquence nucléotidique. Par extension, ce terme
30 s'applique à une mutation dans une séquence d'acides aminés.

On entend par "polymorphisme de type SNP fonctionnel", un

polymorphisme de type SNP compris dans une séquence nucléotidique ou une séquence d'acides aminés ayant une fonctionnalité.

On entend par "fonctionnalité", l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide.

5 La fonctionnalité d'un polypeptide ou d'un polynucléotide conforme à l'invention peut consister en une conservation, une augmentation, une diminution ou une suppression de l'activité biologique du polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence ou de cette dernière séquence nucléotidique.

10 La fonctionnalité d'un polypeptide ou d'un polynucléotide conforme à l'invention peut également consister en un changement de la nature de l'activité biologique du polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence ou de cette dernière séquence nucléotidique.

L'activité biologique peut, notamment, être liée à l'affinité ou à
15 l'absence d'affinité d'un polypeptide conforme à l'invention vis-à-vis d'un récepteur.

Polynucléotide

La présente invention a pour premier objet un polynucléotide isolé
20 comprenant :

a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, plus préférentiellement au moins 95 % d'identité et encore plus préférentiellement au moins 99 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du
25 nucléotide 434 au nucléotide 1003),

étant entendu que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- c641g,

- g798c, ou

30 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

Il est entendu, au sens de la présente invention, que la numérotation correspondant au positionnement des polymorphismes de type SNP c641g et g798c est relative à la numérotation de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1.

5 La présente invention concerne également un polynucléotide isolé comprenant :

a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- 10 - c641g,
- g798c, ou

b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

15 Préférentiellement, le polynucléotide de l'invention consiste en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- c641g,
- g798c; ou

20 Selon l'invention, le polynucléotide défini précédemment comporte préférentiellement un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- c641g, et
- g798c.

25 La présente invention a aussi pour objet un polynucléotide isolé codant pour un polypeptide comprenant :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

30 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,
- C122S.

Il est entendu, au sens de la présente invention, que la numérotation correspondant au positionnement des polymorphismes de type SNP Q70E et
5 C122S est relative à la numérotation de la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.

Selon un objet préféré de l'invention, le polypeptide défini précédemment comporte un seul polymorphisme de type SNP tel que défini ci-dessus.

10 Préférentiellement un polynucléotide conforme à l'invention est composé d'une molécule d'ADN ou d'ARN.

Un polynucléotide conforme à l'invention peut être obtenu par les méthodes standards de synthèse d'ADN ou d'ARN.

Ce polynucléotide peut également être obtenu par mutagenèse
15 dirigée à partir de la séquence nucléotidique du gène IFN α -5 en modifiant l'un au moins des nucléotides c et g par respectivement les nucléotides g et c en position 641 et 798 sur la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

Les procédés de mutagenèse dirigée qui peuvent ainsi être mis en œuvre sont bien connus de l'homme du métier. On peut notamment évoquer la
20 publication de TA Kunkel en 1985 dans "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488.

Un polynucléotide isolé peut également comprendre, par exemple, des séquences nucléotidiques codant pour des séquences d'acides aminés pre-, pro- ou pre-pro-protéine ou des séquences d'acides aminés marqueurs, comme l'hexa-histidine peptide.

25 Un polynucléotide de l'invention peut également être associé à des séquences nucléotidiques codant pour d'autres protéines ou fragments de protéines en vue d'obtenir des protéines de fusion ou à des fins de purification.

Un polynucléotide conforme à l'invention peut également comprendre des séquences nucléotidiques comme les séquences 5' et/ou 3'
30 non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites ou non, des séquences traduites ou non, des séquences signal d'épissage, des séquences

polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

On définit comme séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette
5 séquence nucléotidique, dans des conditions stringentes.

On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes d'hybridation" les conditions chimiques qui permettent une hybridation lorsque les séquences nucléotidiques ont une identité d'au moins 80 %, de préférence supérieure ou égale à 90 %, encore plus
10 préférentiellement supérieure ou égale à 95 % et tout particulièrement supérieure ou égale à 97 %.

Les conditions stringentes peuvent être obtenues selon les méthodes bien connues de l'homme du métier et, par exemple, par une incubation des polynucléotides, à 42° C, dans une solution comprenant 50 % de
15 formamide, 5xSSC (150 Mm de NaCl, 15 mM de trisodium citrate), 50 Mm de sodium phosphate (pH = 7,6), 5x Solution Denhardt, 10 % de dextran sulfate et 20 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé, suivi d'un lavage des filtres à 0,1x SSC, à 65° C.

Dans le cadre de l'invention, lorsque les conditions stringentes
20 d'hybridation permettent une hybridation des séquences nucléotidiques ayant une identité égale à 100 %, on considère que la séquence nucléotidique est strictement complémentaire à la séquence nucléotidique sous a), telle que décrite plus haut.

Il est bien entendu au sens de la présente invention que la
25 séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique comportant l'un au moins des polymorphismes de type SNP conforme à l'invention en anti-sens.

Ainsi, par exemple, si la séquence nucléotidique comporte le polymorphisme de type SNP c641g, sa séquence nucléotidique
30 complémentaire comporte toujours le nucléotide c en position 641.

Identification, hybridation et/ou amplification d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide défini précédemment, pour identifier, hybrider et/ou
5 amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du nucléotide 434 au nucléotide 1003), étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- c641g,
- 10 - g798c.

Génotypage et détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP

La présente invention a également pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide conforme à l'invention comme outil de
15 génotypage.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide conforme à l'invention dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

20 Au sens de l'invention, on définit le génotypage comme un procédé de détermination du génotype d'un individu ou d'une population d'individus.

On entend par "population d'individus", un groupe d'individus déterminés de façon aléatoire ou non. Ces individus peuvent être des humains,
25 des animaux, des micro-organismes ou des plantes.

Les individus peuvent être choisis selon leur ethnie ou selon leur phénotype, notamment ceux qui sont atteints par les dérèglements et/ou maladies suivantes : les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs
30 cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que

celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Un polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention est préférentiellement génotypé dans une population d'individus.

Il existe de multiples technologies de pouvant être mises en oeuvre pour génotyper des polymorphismes de type SNP génotypage (voir notamment Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, pp 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches"). Ces technologies sont basées sur l'un des quatre principes suivants : hybridation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles, élongation d'un oligonucléotide par des didésoxynucléotides en présence ou non de désoxynucléotides, ligation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles ou clivage d'oligonucléotides spécifiques d'allèles. Chacune de ces technologies peut être couplé à un système de détection tel que la mesure de la fluorescence directe ou polarisée, ou la spectrométrie de masse.

Le génotypage peut notamment être effectué par un miniséquençage avec des ddNTPs chauds (2 ddNTPs différents marqués par des fluorophores différents) et froids (2 ddNTPs non marqués), en liaison avec un lecteur de fluorescence polarisé. Le protocole de miniséquençage avec lecture de fluorescence polarisée (Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation) est bien connu de l'homme du métier.

Il peut être réalisé sur un produit obtenu après amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADN de chaque individu. Ce

produit PCR est choisi pour couvrir la région génique du polynucléotide contenant le polymorphisme de type SNP étudié. Après la dernière étape dans le thermocycleur de la PCR, la plaque est alors placée sur un lecteur de fluorescence polarisée pour la lecture des bases marquées en utilisant les
5 filtres d'excitation et d'émission spécifique des fluorophores. Les valeurs d'intensité des bases marquées sont reportées sur un graphe.

Les amorces respectivement sens et antisens pour l'amplification PCR, dans le cas du polymorphisme de type SNP de l'invention, peuvent facilement être choisis par l'homme du métier selon la position des
10 polymorphismes de type SNP conforme à l'invention.

Par exemple, les séquences nucléotidiques sens et antisens pour l'amplification PCR peuvent être respectivement ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4.

Ces séquences nucléotidiques permettent d'amplifier un fragment d'une longueur de 681 nucléotides, du nucléotide 390 au nucléotide 1070 dans
15 la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

Une analyse statistique de la fréquence de chaque allèle (fréquence allélique) codé par le gène comportant le SNP dans la population d'individus est alors effectuée, ce qui permet de déterminer l'importance de leur impact et leur répartition dans les différents sous-groupes et notamment, le cas
20 échéant, les diverses ethnies qui constituent cette population d'individus.

Les données de génotypage sont analysées pour estimer les fréquences de distributions des différents allèles observés dans les populations étudiées. Les calculs de fréquences alléliques peuvent être réalisés à l'aide de logiciels tels SAS-suite® (SAS) ou SPLUS® (MathSoft). La comparaison des
25 distributions alléliques du polymorphisme de type SNP de l'invention au travers des différentes ethnies de la population d'individus peut être réalisée au moyen des logiciels ARLEQUIN® et SAS-suite®.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour la recherche d'une variation dans la
30 séquence nucléotidique du gène IFN α -5 chez un individu.

Vecteur d'expression et cellule hôte

La présente invention a aussi pour objet un vecteur recombinant comprenant au moins un polynucléotide conforme à l'invention.

De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés, comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes, les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus tels que les baculovirus, les papillonna virus comme SV40, les vaccinia virus, les adénovirus, les fox pox virus, les pseudorabies virus, les rétrovirus.

Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence nucléotidique peut être insérée dans le vecteur recombinant d'expression par les méthodes bien connues de l'homme du métier, telles que, par exemple, celles qui sont décrites dans MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra) Sambrook et al..

Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences nucléotidiques de contrôle de la régulation de l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences nucléotidiques permettant l'expression et la transcription d'un polynucléotide de l'invention et la traduction d'un polypeptide de l'invention, ces séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en œuvre.

Ainsi, par exemple, un signal de sécrétion approprié peut être intégré dans le vecteur recombinant pour que le polypeptide, codé par le polynucléotide de l'invention, soit dirigé vers la lumière du réticulum endoplasmique, vers l'espace périplasmique, sur la membrane ou vers l'environnement extracellulaire.

La présente invention a aussi pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant conforme à l'invention.

L'introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte peut être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que celles décrites dans BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis

et al., 1986 et MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, telles que la transfection par calcium phosphate, la transfection par DEAE dextran, la transvection, la microinjection, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes telles que les cellules de streptocoque, de staphylocoque, d'*E. coli* ou de *Bacillus subtilis*, des cellules de champignons telles que les cellules de levure et les cellules d'*Aspergillus*, de *Streptomyces*, des cellules d'insectes telles que les cellules de *Drosophila* S2 et de *Spodoptera* Sf9, des cellules animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 et des cellules humaines du sujet à traiter ou encore des cellules végétales.

Les cellules hôtes peuvent être utilisées, par exemple, pour exprimer un polypeptide de l'invention ou en tant que produit actif dans des compositions pharmaceutiques, comme on le verra ci-après.

Polypeptide

La présente invention a aussi pour objet un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, plus préférentiellement au moins 95 % d'identité et encore plus préférentiellement au moins 99 % d'identité avec:

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou avec

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,
- C122S.

Le polypeptide de l'invention peut également comprendre :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- 5 - Q70E,
- C122S.

Le polypeptide de l'invention peut tout particulièrement consister en :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
10 b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- Q70E,
15 - C122S.

Préférentiellement, un polypeptide conforme à l'invention comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- Q70E, et
- C122S.

- 20 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide ci-dessus décrit, dans lequel une cellule hôte définie précédemment est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

- Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon
25 les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la précipitation à l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate d'ammonium, l'éthanol l'acétone ou l'acide trichloroacétique, l'extraction à l'acide; la chromatographie échangeuse d'ions; la chromatographie par phosphocellulose; la chromatographie par interaction hydrophobe; la
30 chromatographie d'affinité; la chromatographie hydroxylapatite ou les chromatographies d'exclusion.

On entend par "milieu de culture", le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la
5 conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de la purification.

Anticorps

La présente invention a aussi pour objet un procédé d'obtention
10 d'un anticorps immunospcifique.

On entend par "anticorps", les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés ainsi que les fragments Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines.

15 Un anticorps immunospcifique peut être obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne aussi un anticorps immunospcifique pour un polypeptide conforme à l'invention, tel que défini précédemment.

Un polypeptide selon l'invention, un de ses fragments, un
20 analogue, un de ses variants ou une cellule exprimant ce polypeptide peuvent aussi être utilisés pour produire des anticorps immunospcifiques.

Le terme "immunospcifique" signifie que l'anticorps possède une meilleure affinité pour le polypeptide de l'invention que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

25 Les anticorps immunospcifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide de l'invention, d'un de ses fragments, d'un analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce polynucléotide chez un mammifère, de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

30 Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires,

telles que la technique des hybridomes (Kohler et al., Nature (1975) 256 :495-497), la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4 :72) et la technique des hybridomes EBV (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER
5 THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985).

Les techniques de production d'anticorps simple-chaîne telles que décrites, par exemple, dans US N° 4,946, 778 peuvent être également utilisées.

Des animaux transgéniques comme les souris, par exemple, peuvent être également utilisés pour produire des anticorps humanisés.

10

Agents interagissant avec le polypeptide de l'invention

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 15 a) la mise en présence de cellules hôtes, telles que définies ci-dessus avec un agent à tester, et
b) la détermination de l'effet activateur, ou inhibiteur, généré par l'agent à tester.

Un polypeptide conforme à l'invention peut ainsi être employé pour un procédé de criblage de composés qui rentrent en interaction avec celui-
20 ci.

Ces composés peuvent être des agents activateurs (agonistes) ou inhibiteurs (antagonistes) de l'activité intrinsèque d'un polypeptide selon l'invention. Ces composés peuvent également être des ligands ou des substrats d'un polypeptide de l'invention. Voir Coligan et al., Current Protocols in
25 Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991).

En général, pour mettre en place un tel procédé, il est d'abord souhaitable de produire des cellules hôtes appropriées qui expriment un polypeptide conforme à l'invention. De telles cellules peuvent être, par exemple, des cellules de mammifères, de levures, d'insectes comme *Drosophila* ou de
30 bactéries comme *E. coli*.

Ces cellules ou des extraits de membrane de ces cellules, sont alors mises en présence des composés à tester.

On peut ainsi observer la capacité de liaison des composés à tester avec le polypeptide de l'invention, mais également l'inhibition ou
5 l'activation de la réponse fonctionnelle.

L'étape b) du procédé ci-dessus peut être mise en œuvre en utilisant un agent à tester marqué directement ou indirectement. Elle peut aussi comprendre un test de compétition, en utilisant un agent marqué ou non et un agent compétiteur marqué.

10 On peut également déterminer si un agent à tester conduit à la génération d'un signal d'activation ou d'inhibition sur des cellules exprimant le polypeptide de l'invention, en utilisant des moyens de détection appropriés, suivant le signal à détecter.

De tels agents activateurs ou inhibiteurs peuvent être des
15 polynucléotides, et dans certains cas des oligonucléotides ou des polypeptides, comme des protéines ou des anticorps, par exemple.

La présente invention a aussi pour objet une méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 20 a) la mise en présence de cellules hôtes obtenues comme décrit ci-dessus avec un agent à tester, et
b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur, généré par ledit polypeptide sur l'agent à tester.

Un agent activé ou inhibé par le polypeptide de l'invention est un
25 agent qui répond, respectivement, par une activation ou une inhibition en présence de ce polypeptide. Les agents activés ou inhibés, directement ou indirectement, par le polypeptide de l'invention peuvent consister en des polypeptides comme, par exemple, des récepteurs membranaires ou nucléaires, des kinases et plus préférentiellement des tyrosines kinases, des
30 facteurs de transcription ou des polynucléotides.

Détection de maladies

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 5 a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'invention dans le génome du sujet, et/ou
- b) la détermination de la concentration d'un polypeptide selon l'invention chez un sujet.

La détection d'un polynucléotide et/ou la détermination de la
10 concentration d'un polypeptide conforme à l'invention peut permettre de savoir si un sujet est atteint ou risque d'être atteint ou, au contraire, présente une résistance partielle au développement d'une maladie, d'une indisposition ou d'un dérèglement tels que définis précédemment, relatifs à l'expression et/ou l'activité d'un polypeptide de l'invention.

15 Selon l'étape a), la détection du polynucléotide peut être réalisée à partir d'échantillons biologiques du sujet à étudier, tels que des cellules, du sang, de l'urine, de la salive, ou à partir d'une biopsie ou d'une autopsie du sujet à étudier. L'ADN génomique peut être utilisé directement pour la détection ou après à une amplification par PCR, par exemple. L'ARN ou l'ADNc peuvent
20 également être utilisés de façon similaire.

Il est ensuite possible de comparer la séquence nucléotidique d'un polynucléotide conforme à l'invention avec la séquence nucléotidique détectée dans le génome du sujet.

La comparaison des séquences nucléotidiques peut être effectuée
25 par séquençage par des méthodes d'hybridation de l'ADN, par différence de mobilité des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse avec ou sans agents dénaturants ou par différence de températures de fusion. Voir Myers et al., Science (1985) 230 :1242. De telles modifications dans la structure de la séquence nucléotidique en un point précis peuvent également être révélées par
30 des essais de protection aux nucléases, telles que l'ARNase et la nucléase S1 ou encore par des agents chimiques de clivage. Voir Cotton et al., Proc. Nat.

Acad. Sci. USA (1985) 85 :4397-4401. Des sondes oligonucléotidiques comprenant un fragment d'un polynucléotide de l'invention peuvent également être utilisées pour conduire le criblage.

De nombreuses méthodes bien connues de l'homme du métier
5 peuvent être utilisées pour déterminer l'expression d'un polynucléotide de l'invention et pour identifier la variabilité génétique de ce polynucléotide. Voir Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp 610-613.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour effectuer un diagnostic génétique
10 d'une maladie ou d'une résistance à une maladie liée à la présence, chez un ou plusieurs individus de la population humaine, de l'allèle mutant codé par le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention.

Ces maladies peuvent être des dérèglements et/ou des maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes,
15 les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le
20 SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite
25 rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Préférentiellement, ces maladies peuvent être des dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les hépatites chroniques B et C, les
30 leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs

carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

5 La détermination de la concentration d'un polypeptide selon l'invention, dans l'étape b), peut également aider au diagnostic d'une maladie, d'une indisposition ou d'un dérèglement ou, au contraire, la résistance à une maladie, une indisposition ou un dérèglement chez un sujet en prélevant un échantillon dérivé de ce sujet.

10 L'augmentation ou la diminution de l'expression du polypeptide peut être mesurée en quantifiant le niveau d'ARN codant pour ce polypeptide, suivant les méthodes bien connues de l'homme du métier, par exemple, par PCR, RT-PCR, protection à l'ARNase, Northern blot, et autres méthodes d'hybridation.

15 Il est également possible de déterminer la concentration en polypeptides de l'invention présents dans un échantillon biologique du sujet par des méthodes bien connues, par exemple, par radioimmunoessai, tests de liaisons compétitives, Western blot et tests ELISA.

 Consécutivement à l'étape b), on peut comparer la concentration
20 déterminée en polypeptide conforme à l'invention avec la concentration en protéine IFN α -5 naturel habituellement rencontrée chez un sujet.

 L'homme du métier peut identifier le seuil au-dessus ou en dessous duquel apparaît la sensibilité ou, au contraire, la résistance à la maladie, l'indisposition ou le dérèglement évoqué ci-dessus, à l'aide des
25 publications de l'art antérieur ou par des tests ou des essais conventionnels, comme ceux qui sont mentionnés précédemment.

Médicaments et traitements des maladies

La présente invention a aussi pour objet un médicament renfermant, à titre de principe actif, un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Préférentiellement, un polypeptide conforme à l'invention peut être utilisé pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

Certains des composés permettant d'obtenir le polypeptide conforme à l'invention ainsi que les composés obtenus ou identifiés par ou à

partir de ce polypeptide peuvent également être utilisés pour le traitement thérapeutique du corps humain, c'est-à-dire à titre de médicament.

C'est pourquoi la présente invention a aussi pour objet un médicament contenant, à titre de principe actif un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention, d'un vecteur recombinant défini précédemment, d'une cellule hôte définie précédemment, d'un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Préférentiellement, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention peuvent être utilisés

pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes
5 folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

Le dosage d'un polypeptide et des autres composés de l'invention,
10 utiles en tant que principe actif, dépend du choix du composé, du mode d'administration, de la nature de la formulation, de la nature du sujet et du jugement du médecin.

Lorsqu'il est utilisé comme principe actif, un polypeptide conforme à l'invention est généralement administré à des doses comprises entre 1 et
15 100 µg/kg du sujet.

L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps
20 défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Dans ces compositions pharmaceutiques, le principe actif est avantageusement présent à des doses physiologiquement efficaces.

25 Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les caramels, les suppositoires et de préférence les préparations injectables et les poudres pour
30 injectables. Ces formes pharmaceutiques peuvent être préparées selon les méthodes usuelles.

Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le dextrose, le glycérol, l'éthanol, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux
5 ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Le ou les principes actifs conforme à l'invention peuvent être employés seul ou en combinaison avec d'autres composés, tels que des
10 composés thérapeutiques tels que d'autres IFNs α , voire d'autres cytokines comme l'interleukine, par exemple.

Les différentes formulations des compositions pharmaceutiques sont adaptées suivant le mode d'administration.

Les compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par
15 les différentes voies d'administration connues de l'homme du métier.

L'invention a également pour objet une composition de diagnostic qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps
20 défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

Les excipients appropriés utilisés dans la composition de diagnostic sont généralement des tampons et des conservateurs.

25 La présente invention a également pour objet l'utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur défini précédemment et/ou
- b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'invention, et/ou
- 30 c) d'un polynucléotide selon l'invention, et/ou
- d) d'une cellule hôte du sujet à traiter, définie précédemment,

pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

5 Ainsi, pour traiter un sujet qui a besoin d'une augmentation de l'expression ou de l'activité d'un polypeptide de l'invention, plusieurs méthodes sont possibles.

Il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide de l'invention et/ou d'un agent activateur et/ou activé tels que définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10 Il est également possible d'augmenter la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide selon l'invention. Par exemple, ce polynucléotide peut être inséré dans un vecteur rétroviral d'expression. Un tel vecteur peut être isolé à partir de cellules ayant été infectées par un vecteur de plasmide rétroviral contenant de l'ARN
15 codant pour le polypeptide de l'invention, de telle façon pour que les cellules transduites produisent des particules virales infectieuses contenant le gène d'intérêt. Voir Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

20 Il est également possible d'administrer au sujet des cellules hôtes lui appartenant, ces cellules hôtes ayant été prélevées et modifiées, au préalable, de façon à exprimer le polypeptide de l'invention, comme décrit précédemment.

La présente invention concerne également l'utilisation

- 25 a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur défini précédemment, et/ou
b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps immunospcifique défini précédemment, et/ou
c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide
30 conforme à l'invention,
pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité, chez

un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

Ainsi, il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur et/ou d'un anticorps tels que définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Il est également possible de diminuer la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide complémentaire conforme à l'invention permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide de l'invention.

AUTRES POLYMORPHISMES DE TYPE SNP

La demanderesse a également identifié un troisième polymorphisme de type SNP dans la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence de l'IFN α -5. Ce polymorphisme de type SNP est appelé a516g. Ce polymorphisme de type SNP entraîne une mutation de l'acide aminé glutamine (Q) en position 28 dans la protéine immature du gène IFN α -5, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en arginine (R) et en position 3 de la protéine mature.

La demanderesse a aussi identifié un polymorphisme de type SNP silencieux c886t dans la séquence codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1, qui n'entraîne pas de modification dans la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 de la protéine immature du gène IFN α -5 (thréonine en position 151).

Enfin, la demanderesse a identifié 7 polymorphismes de type SNP dans la séquence non codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1. Ces polymorphismes sont les suivants : c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c et g1009a.

Les lettres a, t, c et g pour les polymorphismes de type SNP mentionnés précédemment signifient respectivement adénine, thymine, cytosine et guanine. Sauf indication contraire, les numérotations ci-dessus font référence au positionnement des polymorphismes de type SNP mentionnés

précédemment sur la séquence nucléotidique ID SEQ N°1.

PARTIE EXPERIMENTALE

Exemple 1 : Modélisation d'une protéine codée par un polynucléotide de
5 séquence nucléotidique comportant un polymorphisme de type SNP c641g ou
g798c et de la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène sauvage
de référence

Dans une première étape la structure tridimensionnelle de IFN α -5
a été construite à partir de celle de IFN α -2 dont la structure est disponible dans
10 la base de données PDB (code 1ITF) et ce en utilisant le logiciel Modeler (MSI,
San Diego, CA).

Le fragment polypeptidique mature a ensuite été modifié de façon
à reproduire la mutation Q47E ou C99S.

Un millier d'étapes de minimisations moléculaires ont été
15 conduites sur ce fragment muté en utilisant les programmes AMBER et
DISCOVER (MSI : Molecular Simulations Inc.).

Deux suites de calculs de dynamiques moléculaires ont ensuite
été effectuées avec le même programme et les mêmes champs de forces.

Dans chaque cas, 50000 étapes ont été calculées à 300°K,
20 terminées par 300 étapes d'équilibration.

Le résultat de cette modélisation est visualisé sur les Figures 1, 2,
3 et 4

Exemple 2 : Génotypage des polymorphismes de type SNP c641g ou g798c
25 dans une population d'individus

Le génotypage de SNPs est basé sur le principe du
miniséquençage dont le produit est détecté par une lecture de fluorescence
polarisée. La technique consiste en un miniséquençage fluorescent
(Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-
30 terminator Incorporation).

Le miniséquençage consiste à allonger un oligonucléotide amorce,

placé juste en amont du site polymorphe, par des didéoxynucléotides fluoromarqués à l'aide d'une enzyme polymérase. Le résultat de cet allongement est directement analysé par une lecture de fluorescence polarisée.

5 Le génotypage requiert 5 étapes :

- 1) Amplification par PCR
- 2) Purification du produit de PCR par digestion enzymatique
- 3) Elongation de l'oligonucléotide amorce
- 4) Lecture

10 5) Interprétation de la lecture

Les étapes de génotypage 1 et 2 sont réalisées de manière identique pour chacun des polymorphismes de type SNP c641g et g798c.

15 Les étapes 3, 4 et 5 sont spécifiques à chacun de ces polymorphismes.

1) L'amplification PCR de la séquence nucléotidique du gène IFN α -5 est effectuée à partir d'ADN génomique provenant de 239 individus d'origine ethniques diverses.

20 Ces ADNs génomiques ont été fournis par l'Institut Coriell aux Etats-Unis.

Les 239 individus se répartissent comme suit :

POPULATION	DESCRIPTION	NOMBRE D'INDIVIDUS
1	Afro Américain	50
2	Amérindien du Sud Ouest	5
3	Sud Américain (Andes)	10
4	Caribéen	10
5	Caucasien	50
6	Chinois	10
7	Grec	8
8	Ibérien	10
9	Italien	10
10	Japonais	10
11	Mexicain	10
12	Moyen-Orient	20
13	Individus du Pacifique	7
14	Indo-Pakistanaï	9
15	Sud Américain	10
16	Asie du Sud	10

L'ADN génomique issu de chacun des individus constitue un échantillon.

L'amplification PCR est réalisée à partir des amorces suivantes :

- 5 ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4.

Ces séquences nucléotidiques permettent d'amplifier un fragment d'une longueur de 681 nucléotides, du nucléotide 390 au nucléotide 1070 dans la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

- 10 Le volume réactionnel total mis en œuvre pour l'amplification PCR est de 5 µl par échantillon.

Ce volume réactionnel est composé par les réactifs indiqués dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube (µl)	Conc. finale
Life Technologie	Livré avec Taq	Tampon (X)	10	0,5	1
Life Technologie	Livré avec Taq	MgSO ₄ (mM)	50	0,2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0,1	0,2
	Sur demande	Amorce F (µM) ID SEQ N° 4	10	0,1	0,2
	Sur demande	Amorce R (µM) ID SEQ N° 5	10	0,1	0,2
Life Technologie	11304-029	Taq platinum	5U/ µl	0,02	0,1 U/ réaction
		H ₂ O	Qsp 5 µl	1,98	
		ADN (échantillon)	2,5 ng/ µl	2	5 ng/ réaction
		Volume total		5 µl	

Ces réactifs sont distribués dans une plaque PCR noire à 384 puits fournie par ABGene (ref :TF-0384-k). La plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles de PCR : 1 min à 94° C, suivi de 36 cycles composés de 3 étapes (15 sec. à 94° C, 30 sec. à 56° C, 1 min. à 68° C).

2) L'amplifiat PCR est ensuite purifié à l'aide de deux enzymes: la phosphatase alcaline de crevette (ou Shrimp Alkaline Phosphatase SAP) et l'exonucléase I (Exo I). La première de ces enzymes permet la déphosphorylation des dNTPs non incorporés au cours de l'amplification PCR, tandis que la seconde élimine les résidus simple brin d'ADN, en particulier les amorces non utilisées au cours de la PCR.

Cette digestion se fait par addition dans chaque puits de la plaque PCR d'un mélange réactionnel de 5 µl par échantillon.

Ce mélange réactionnel est composé des réactifs suivants :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube (μ l)	Conc. finale
AP Biotech	E70092X	SAP	1 U/ μ l	0,5	0,5/ réaction
AP Biotech	070073Z	Exo I	10 U/ μ l	0,1	1/ réaction
AP Biotech	Fourni avec SAP	Tampon SAP (X)	10	0,5	1
		H ₂ O	Qsp 5 μ l	3,9	
		PCR amplifiat		5 μ l	
		Vol total		10 μ l	

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Digestion SAP-EXO : 45 min à 37° C, 15 min à 80° C.

5

L'étape d'élongation ou de miniséquençage est ensuite réalisée sur ce produit de PCR digéré, par addition d'un mélange réactionnel de 5 μ L par échantillon préparé.

Le miniséquençage 3) et les étapes de lecture 4) et d'interprétation de lecture 5) sont spécifique à chaque polymorphisme de type SNP c641g et g798c.

Toutes ces étapes sont décrites ci-après pour chacun de ces polymorphismes.

15

3.1) Polymorphisme de type SNP c641g

L'étape d'élongation ou de miniséquençage est réalisée comme indiqué dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube (µl)	Conc. finale
Propre préparation		Tampon Elongation ¹ (X)	5	1	1
Life Technologies	Sur demande	Amorce Miniseq (µM) A ou B	10	0,5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs ² (µM) 2 non marqués	2,5 de chaque	0,25	0,125 de chaque
NEN	Nel 472/5 et Nel 492/5	ddNTPs ² (µM) 2 marqués Tamra et R110	2,5 de chaque	0,25	0,125 de chaque
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequenase	3,2 U/ µl	0,125	0,4 U/ réaction
		H2O	Qsp 5 µl	3,125	
		PCR digérée		10 µl	
		Vol total		15 µl	

¹ Le tampon élongation : Le tampon élongation 5X est composé de Tris-HCl pH 9 à 250 mM, de KCl à 250 mM, de NaCl à 25 mM, de MgCl₂ à 10 mM et de glycérol à 40 %.

² ddNTPs : Pour les ddNTPs, un mélange des 4 bases est réalisé en fonction du polymorphisme étudié. Seulement les 2 bases d'intérêts (C/G) composant le polymorphisme de type SNP fonctionnel portent un marquage, soit en Tamra, soit en R110. Le mélange de ddNTPs est composé de :

- 2,5 µM de ddATP non marqué,
- 2,5 µM de ddTTP non marqué,
- 2,5 µM de ddGTP (1,875 µM de ddGTP non marqué et 0,625 µM de ddGTP marqué au Tamra),
- 2,5 µM de ddCTP (1,875 µM de ddCTP non marqué et 0,625 µM de ddCTP marqué au R110).

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles d'élongation : 1 min. à 93° C, suivi de 35 cycles composés de 2 étapes (10 sec. à 93° C, 30 sec. à 55° C).

Après la dernière étape dans le thermocycleur, la plaque est directement placée sur un lecteur de fluorescence polarisée de type Analyst® HT de LJJL Biosystems Inc.. La plaque est lue à l'aide du logiciel Criterion Host® en utilisant deux méthodes. La première permet de lire la base

marquée en Tamra en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 550-10 nm, émission 580-10 nm) et la seconde permet de lire la base marquée en R110 en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 490-10 nm, émission 520-10 nm). Dans les deux cas, un miroir double dichroïque (R110/Tamra) est utilisé et les autres paramètres de lecture sont :

Z-height : 1,5 mm

Attenuator : out

Temps d'intégration : 100,000 µsec.

10 Raw data units : counts/sec

Switch polarization : by well

Plate settling time : 0 msec

PMT setup : Smart Read (+), sensitivity 2

Dynamic polarizer : emission

15 Static polarizer : S

Un fichier résultat est alors obtenu contenant les valeurs calculées de mP (milliPolarization) pour le filtre Tamra et celle pour le filtre R110. Ces valeurs de mP sont calculées à partir des valeurs d'intensité obtenues sur le plan parallèle(//) et sur le plan perpendiculaire (⊥) d'après la formule suivante :

$$20 \quad mP = 1000(// - g\perp)/(// + g\perp).$$

Dans ce calcul, la valeur ⊥ est pondérée d'un facteur g. Celui-ci est un paramètre machine qui doit être déterminé préalablement expérimentalement.

25 4.1) et 5.1) Interprétation de la lecture et détermination des génotypes.

Les valeurs de mP sont reportées sur un graphe à l'aide du logiciel Excel de Microsoft Inc., et/ou du logiciel Allele Caller® développé par LJL Biosystems Inc..

30 En abscisse est indiquée la valeur de mP de la base marquée au Tamra, en ordonnée est indiquée la valeur de mP de la base marquée au R110.

Une forte valeur de mP indique que la base marquée avec ce fluorophore est incorporée et, inversement, une faible valeur de mP révèle l'absence d'incorporation de cette base.

On obtient jusqu'à trois groupes homogènes de séquences
5 nucléotidiques ayant des génotypes différents, comme indiqué dans la Figure 5.

L'utilisation du logiciel Allele Caller® permet, une fois le repérage des différents groupes réalisé, d'extraire directement le génotype défini pour chaque individu sous forme d'un tableau, mentionné ci-après.

Les séquences des deux amorces de miniséquençage
10 nécessaires pour le génotypage ont été déterminées de façon à être placées en amont du site du polymorphisme de type SNP. Le produit de PCR qui comporte le polymorphisme de type SNP étant un produit d'ADN double brin, le génotypage peut donc se faire soit sur le brin sens soit sur le brin antisens. Les amorces sélectionnées sont fabriquées par Life Technologies Inc.

15 Les amorces du miniséquençage sont les suivantes :

Amorce sens : (A) : aggaggagtttgatggcaac

Amorce antisens : (B) : ggcttgagccttctggaact

Le miniséquençage du polymorphisme de type SNP c641g a
d'abord été validé sur 16 échantillons, puis génotypé sur l'ensemble de la
20 population d'individus composée de 239 individus et 7 blancs.

Conditions de miniséquençage testées :

Condition N° 1 :

Amorce sens + ddCTP-R110 + ddGTP-Tamra

Condition N° 2 :

25 Amorce sens + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

Condition N° 3 :

Amorce antisens + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

Condition N° 4 :

Amorce antisens + ddCTP-R110 + ddGTP-Tamra

30 Ces 4 conditions ont été testées et la condition N° 1 a été retenue pour le génotypage.

Résultats du miniséquençage pour le polymorphisme de type SNP c641g

Après la réalisation complète du processus de génotypage, la détermination des génotypes des individus de la population d'individus pour la

5 SNP fonctionnel étudié ici a été réalisée à l'aide du graphe représenté à la Figure 5.

Ce génotype est en théorie soit homozygote CC, soit hétérozygote CG, soit homozygote GG chez les individus testés. En réalité et comme montré ci-dessous, le génotype homozygote GG n'est pas détecté dans la population

10 d'individus.

Les résultats des contrôles, de la répartition des génotypes déterminés dans la population d'individus et le calcul des différentes fréquences alléliques pour ce polymorphisme de type SNP fonctionnel sont présentés dans les tableaux suivants :

15

Nombre d'individus		Nombre de blanc		Pourcentage de réussite
testés	génotypés	testés	validés	
239	233	7	7	97,6

POPULATION	Fréquence allélique			Génotype AA		Génotype AG		Génotype GG			
	N	%	%	95 % IC		N	%	N	%		
Afro Américain	50	20,9	5,0	0,7	9,3	0	0,0	5	10,0	45	90,0
Amérindien du Sud Ouest	5	2,1	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	5	100,0
Sud Américain (Andes)	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Caribéen	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Caucasien	50	20,9	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	49	100,0
Chinois	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Grec	8	3,3	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Ibérien	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Italien	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	9	100,0
Japonais	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Méxicain	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Moyen-Orient	20	8,4	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	20	100,0
Individus du Pacifique	7	2,9	10,0	0,0	28,6	0	0,0	1	20,0	4	80,0
Indo-Pakistanaïs	9	3,8	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	9	100,0
Sud Américain	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Asie du Sud	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Total	239		1,3	0,3	2,3	0	0,0	6	2,6	227	97,4

Dans le tableau ci-dessus,

- N représente le nombre d'individus,
- % représente le pourcentage d'individus dans la sous-population spécifique,
- la fréquence allélique représente le pourcentage de l'allèle muté dans la sous-population spécifique,
- 95 % IC représente l'intervalle minimal et maximal de confiance à 95 %.

En examinant ces résultats par population, on constate que les 6 individus hétérozygotes CG sont issus des sous-populations "afro-américaine" et "individus du Pacifique" de la population d'individus.

3.2) Polymorphisme de type SNP g798c

L'étape d'élongation ou de miniséquençage est réalisée comme indiqué dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube (µl)	Conc. finale
Propre préparation		Tampon Elongation ¹ (X)	5	1	1
Life Technologies	Sur demande	Amorce Miniseq (µM) C ou D	10	0,5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs ² (µM) 2 non marqués	2,5 de chaque	025	0,125 de chaque
NEN	Nel 472/5 et Nel 492/5	ddNTPs ² (µM) 2 marqués Tamra et R110	2,5 de chaque	0,25	0,125 de chaque
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequenase	3,2 U/ µl	0,125	0,4 U/ réaction
		H2O	Qsp 5 µl	3,125	
		PCR digérée		10 µl	
		Vol total		15 µl	

¹ Le tampon élongation : Le tampon élongation 5X est composé de Tris-HCl pH 9 à 250 mM, de KCl à 250 mM, de NaCl à 25 mM, de MgCl₂ à 10 mM et de glycérol à 40 %.

² ddNTPs : Pour les ddNTPs, un mélange des 4 bases est réalisé en fonction du polymorphisme étudié. Seulement les 2 bases d'intérêts (C/G) composant le polymorphisme de type SNP fonctionnel portent un marquage, soit en Tamra, soit en R110. Le mélange de ddNTPs est

composé de :

- 2,5 μM de ddATP non marqué,
- 2,5 μM de ddTTP non marqué,
- 2,5 μM de ddCTP (1,875 μM de ddCTP non marqué et 0,625 μM de ddCTP marqué au Tamra),
- 5 - 2,5 μM de ddGTP (1,875 μM de ddGTP non marqué et 0,625 μM de ddGTP marqué au R110).

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles d'élongation : 1 min. à 93° C, suivi de 35 cycles
10 composés de 2 étapes (10 sec. à 93° C, 30 sec. à 55° C).

Après la dernière étape dans le thermocycleur, la plaque est directement placée sur un lecteur de fluorescence polarisée de type Analyst® HT de LJJL Biosystems Inc.. La plaque est lue à l'aide du logiciel Criterion Host® en utilisant deux méthodes. La première permet de lire la base
15 marquée en Tamra en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 550-10 nm, émission 580-10 nm) et la seconde permet de lire la base marquée en R110 en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 490-10 nm, émission 520-10 nm). Dans les deux cas, un miroir double dichroïque (R110/Tamra) est
20 utilisé et les autres paramètres de lecture sont :

Z-height : 1,5 mm

Attenuator : out

Temps d'intégration : 100,000 μsec .

Raw data units : counts/sec

25 Switch polarization : by well

Plate settling time : 0 msec

PMT setup : Smart Read (+), sensitivity 2

Dynamic polarizer : emission

Static polarizer : S

30 Un fichier résultat est alors obtenu contenant les valeurs calculées de mP pour le filtre Tamra et celle pour le filtre R110. Ces valeurs de mP sont calculées à partir des valeurs d'intensité obtenues sur le plan parallèle(//) et sur

le plan perpendiculaire (\perp) d'après la formule suivante :

$$mP = 1000((// - g\perp)/(// + g\perp)).$$

Dans ce calcul, la valeur \perp est pondérée d'un facteur g. Celui-ci est un paramètre machine qui doit être déterminé préalablement
5 expérimentalement.

4.2) et 5.2) Interprétation de la lecture et détermination des génotypes.

Les valeurs de mP sont reportées sur un graphe à l'aide du
10 logiciel Excel de Microsoft Inc., et/ou du logiciel Allele Caller® développé par LJI Biosystems Inc..

En abscisse est indiquée la valeur de mP de la base marquée au Tamra, en ordonnée est indiquée la valeur de mP de la base marquée au R110. Une forte valeur de mP indique que la base marquée avec ce fluorophore est
15 incorporée et, inversement, une faible valeur de mP révèle l'absence d'incorporation de cette base.

On obtient jusqu'à trois groupes homogènes de séquences nucléotidiques ayant des génotypes différents, comme indiqué dans la Figure 6.

L'utilisation du logiciel Allele Caller® permet, une fois le repérage
20 des différents groupes réalisé, d'extraire directement le génotype défini pour chaque individu sous forme d'un tableau, mentionné ci-après.

Les séquences des deux amorces de miniséquençage nécessaires pour le génotypage ont été déterminées de façon à être placées en amont du site du polymorphisme de type SNP. Le produit de PCR qui comporte
25 le polymorphisme de type SNP étant un produit d'ADN double brin, le génotypage peut donc se faire soit sur le brin sens soit sur le brin antisens. Les amorces sélectionnées sont fabriquées par Life Technologies Inc.

Les amorces du miniséquençage sont les suivantes :

Amorce sens : (C) : gctgaatgacctggaagcct

30 Amorce antisens : (D) : ctccaacctcctgcata

Le miniséquençage du polymorphisme de type SNP g798c a

d'abord été validé sur 16 échantillons, puis génotypé sur l'ensemble de la population d'individus composée de 239 individus et de 7 blancs.

Conditions de miniséquençage testées :

Condition N° 1 :

- 5 Amorces sens + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

Condition N° 2 :

Amorce sens + ddCTP-R110 + ddGTP-Tamra

Condition N° 3 :

Amorce antisens + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

- 10 Condition N° 4 :

Amorce antisens + ddCTP-R110 + ddGTP-Tamra

Ces 4 conditions ont été testées et la condition N° 4 a été retenue pour le génotypage.

15 Résultats du miniséquençage pour le polymorphisme de type SNP g798c

Après la réalisation complète du processus de génotypage, la détermination des génotypes des individus de la population d'individus pour la SNP fonctionnel étudié ici a été réalisée à l'aide du graphe représenté à la Figure 6.

- 20 Ce génotype est en théorie soit homozygote cc, soit hétérozygote cg, soit homozygote gg chez les individus testés. En réalité et comme montré ci-dessous, le génotype homozygote gg n'est pas détecté dans la population d'individus.

- 25 Les résultats des contrôles, de la répartition des génotypes déterminés dans la population d'individus et le calcul des différentes fréquences alléliques pour ce polymorphisme de type SNP fonctionnel sont présentés dans les tableaux suivants :

Nombre d'individus		Nombre de blanc		Pourcentage de réussite
testés	génotypés	testés	validés	
239	238	7	7	99,6

POPULATION	N	%	Fréquence allélique			Génotype GG		Génotype GC		Génotype CC	
			%	95 % IC		N	%	N	%	N	%
Afro Américain	50	20,9	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	50	100,0
Amérindien du Sud Ouest	5	2,1	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	5	100,0
Sud Américain (Andes)	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Caribéen	10	4,2	5,0	0,0	14,6	0	0,0	1	10,0	9	90,0
Caucasien	50	20,9	1,0	0,0	3,0	0	0,0	1	2,0	49	98,0
Chinois	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Grec	8	3,3	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Ibérien	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Italien	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Japonais	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Méxicain	10	4,2	5,0	0,0	14,6	0	0,0	1	10,0	9	90,0
Moyen-Orient	20	8,4	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	20	100,0
Individus du Pacifique	7	2,9	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	7	100,0
Indo-Pakistanaï	9	3,8	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Sud Américain	10	4,2	5,0	0,0	14,6	0	0,0	1	10,0	9	90,0
Asie du Sud	10	4,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Total	239		0,8	0,0	1,7	0	0,0	4	1,7	234	98,3

Dans le tableau ci-dessus,

- N représente le nombre d'individus,
 - % représente le pourcentage d'individus dans la sous-population spécifique,
 - la fréquence allélique représente le pourcentage de l'allèle muté dans la sous-population spécifique,
- 5
- 95 % IC représente l'intervalle minimal et maximal de confiance à 95 %.

Il faut préciser que l'allèle c lu en antisens correspond à l'allèle g lu en sens, soit à la présence d'un C en position 122 de la de la protéine IFN α -5 et donc que l'allèle g lu en antisens correspond à l'allèle c lu en sens

10 correspondant à un S pour cette position dans la séquence de la protéine correspondante.

En examinant ces résultats par population, on constate que les 4 individus hétérozygotes CG issus des sous-populations caribéenne, caucasienne, mexicaine, sud américaine de la population d'individus.

REVENDICATIONS

1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- c641g,
 - g798c, ou
- 10 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- c641g,
 - g798c, ou
- b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

- 20 3. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune des séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- c641g,
- 25 - g798c.

4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique a) comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- c641g, et
- 30 - g798c,

REVENDEICATIONS

1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la
séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que cette
séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de
type SNP suivants :
- c641g,
 - g798c, ou
- 10 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique
sous a).

2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant
entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des
polymorphismes de type SNP suivants :
- c641g,
 - g798c, ou
- b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique
sous a).

- 20 3. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2,
caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence
codante, étant entendu que chacune des séquences comporte au moins l'un
des polymorphismes de type SNP suivants :

- c641g,
- 25 - g798c.

4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,
caractérisé en ce que la séquence nucléotidique a) comporte un seul
polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- c641g, et
- 30 - g798c,

5. Polynucléotide isolé, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre

5 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,
- C122S.

10 6. Polynucléotide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comportant un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- Q70E, et
- C122S.

15 7. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est composé d'une molécule d'ADN ou d'ARN.

8. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa

20 séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants:

- c641g,
- g798c.

9. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une

25 quelconque des revendications 1 à 7, comme outil de génotypage.

10. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

30 11. Procédé de détermination selon la revendication 10, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.

5. Polynucléotide isolé, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre

5 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

- C122S.

10 6. Polynucléotide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comportant un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- Q70E, et

- C122S.

15 7. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est composé d'une molécule d'ADN ou d'ARN.

8. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa

20 séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants:

- c641g,

- g798c.

25 9. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comme outil de génotypage.

10. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

30 11. Procédé de détermination selon la revendication 10, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.

12. Procédé de détermination selon la revendication 11, dans lequel le miniséquençage est réalisé avec les amorces sens et antisens correspondant respectivement aux séquences nucléotidique ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4.

5 13. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la recherche d'une variation de séquence dans la séquence nucléotidique du gène IFN α -5 chez un individu.

14. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10 15. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 14.

16. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'une cellule hôte selon la revendication 15 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

15 17. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

20 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

- C122S.

25 18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

30 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

12. Procédé de détermination selon la revendication 11, dans lequel le miniséquençage est réalisé sur un produit PCR obtenu avec les amorces sens et antisens correspondant respectivement aux séquences nucléotidique ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4.

5 13. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la recherche d'une variation de séquence dans la séquence nucléotidique du gène IFN α -5 chez un individu.

14. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10 15. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 14.

16. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'une cellule hôte selon la revendication 15 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

15 17. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

20 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

- C122S.

25 18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

30 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

- C122S.

19. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, caractérisé en ce qu'il consiste en

- 5 a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

10 - C122S.

20. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par:

15 - Q70E, et

- C122S.

21. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospcifique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

20 22. Anticorps immunospcifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

23. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

- 25 a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent à tester, et
b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

24. Agent activateur ou inhibiteur, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être identifié par la méthode selon la revendication 23.

30 25. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent

- C122S.

19. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, caractérisé en ce qu'il consiste en

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

5 b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- Q70E,

10 - C122S.

20. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par:

15 - Q70E, et

- C122S.

21. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospcifique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

20 22. Anticorps immunospcifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

23. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent

25 à tester, et

b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

24. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent

30 à tester, et

b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide

à tester, et

- b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide sur l'agent à tester.

26. Agent activé ou inhibé, caractérisé en ce qu'il est susceptible
5 d'être identifié par la méthode selon la revendication 25.

27. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

- a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans le génome du sujet, et/ou
- 10 b) la détection de la concentration d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, dans un échantillon biologique du sujet.

28. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

29. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des
15 revendications 17 à 20, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies
20 cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou
25 d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par
30 chimiothérapie.

30. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 29, pour la

sur l'agent à tester.

25. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

- a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 7 dans le génome du sujet, et/ou
- b) la détection de la concentration d'un polypeptide selon l'une quelconque des
 revendications 17 à 20, dans un échantillon biologique du sujet.

26. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

- 10 27. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et
15 les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie
20 d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les
25 désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

28. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 27, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les hépatites chroniques B
30 et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les

préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

31. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15, un anticorps selon la revendication 22 et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 24.

32. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15, d'un anticorps selon la revendication 22 et/ou d'un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 24, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux

tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

5 29 Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucleotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 22.

10 30. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou d'un anticorps selon la revendication 22, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les
15 myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives,
20 les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns,
25 les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

31. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou d'un anticorps selon la revendication
30 22, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les

traitements par chimiothérapie.

33. Utilisation d'un polynucléotide, d'un vecteur recombinant, d'une cellule hôte, d'un anticorps et/ou d'un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 32, pour la préparation d'un médicament destiné à la
5 prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie
10 de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

34. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un
15 vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15, un anticorps selon la revendication 22 et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 24, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

35. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif
20 au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15, un anticorps selon la revendication 22 et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 24, ainsi qu'un excipient approprié
25 pharmaceutiquement acceptable.

36. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur selon la revendication 24, et/ou
- b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une
30 quelconque des revendications 17 à 20, et/ou
- c) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et/ou

hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

32. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 22, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

33. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 22, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

34. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, et/ou
 - b) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et/ou
 - c) d'une cellule hôte selon la revendication 15, cette cellule provenant du sujet à traiter,
- pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

35. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la revendication 22, et/ou
- b) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon

57

- d) d'une cellule hôte selon la revendication 15, cette cellule provenant du sujet à traiter,
pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à
5 20.

37. Utilisation

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur selon la revendication 24, et/ou
b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la
10 revendication 21, et/ou
c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7,
pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité chez un sujet d'un polypeptide selon l'une quelconque des
15 revendications

l'une quelconque des revendications 1 à 7,
pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou
l'activité chez un sujet d'un polypeptide selon l'une quelconque des
revendications

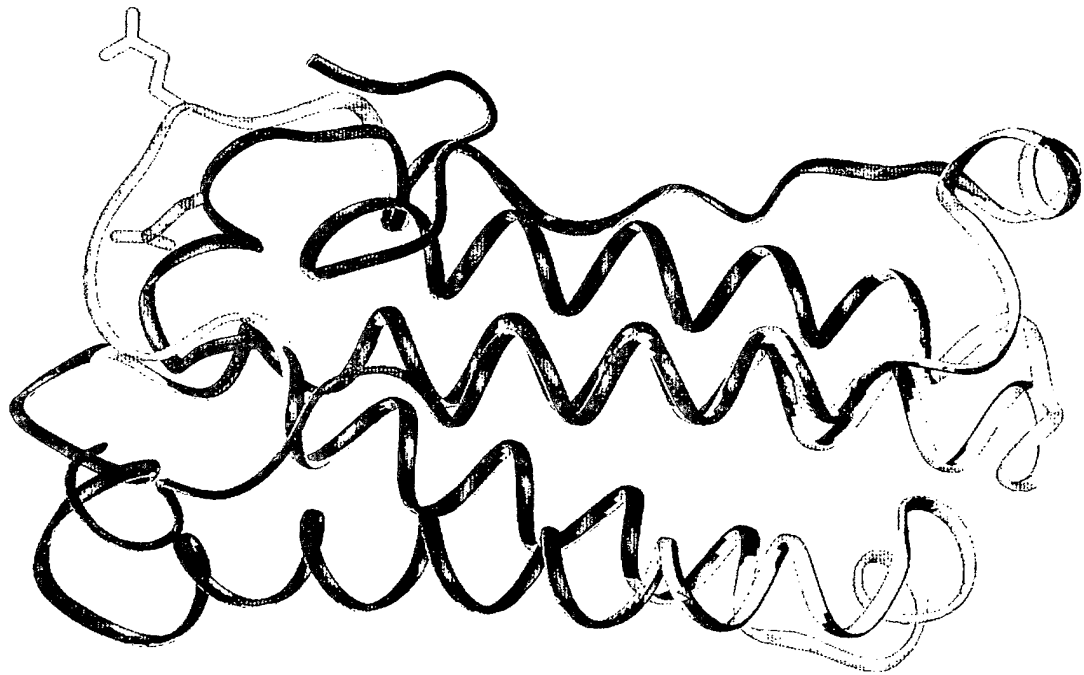


Figure 1

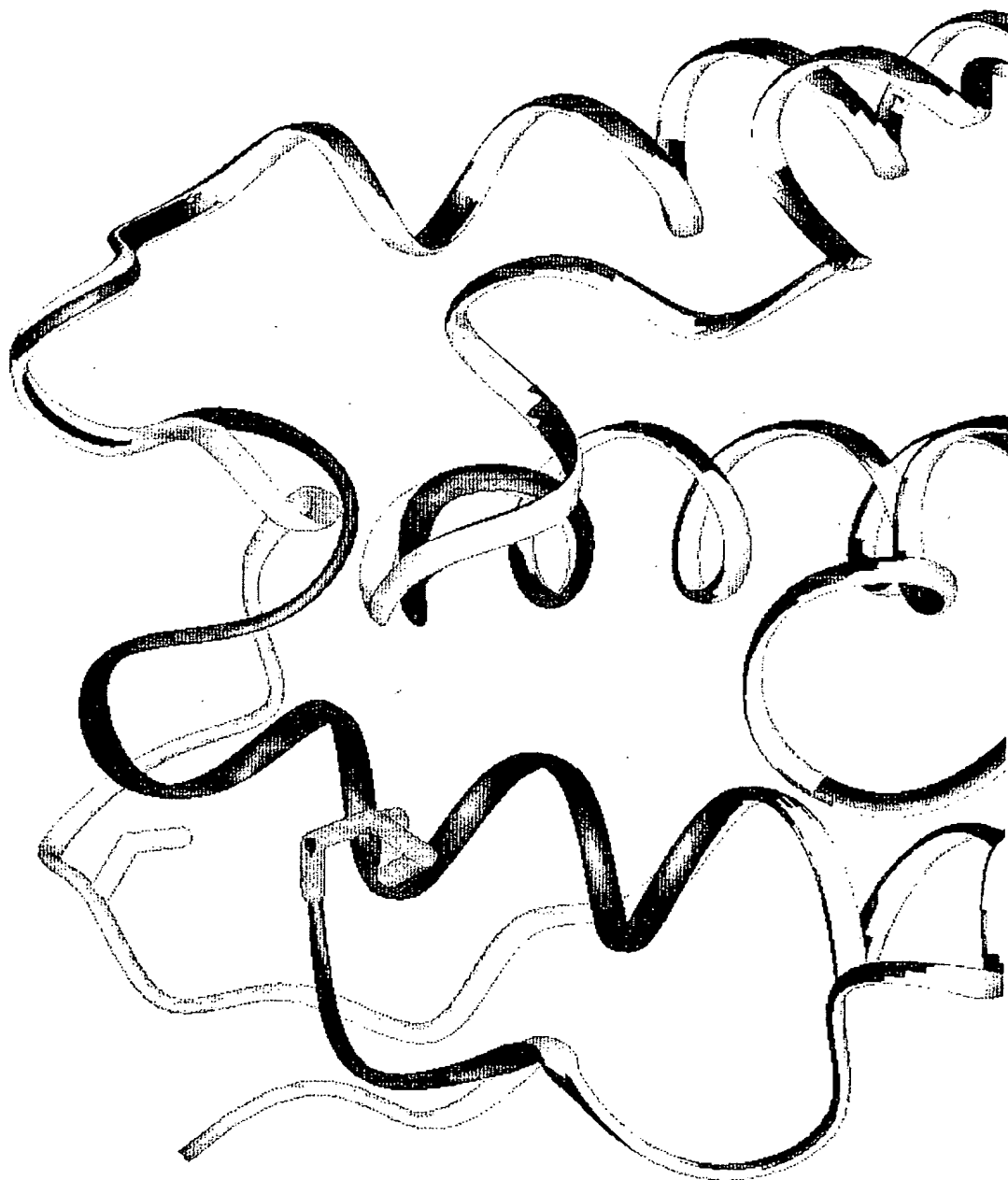
Figure 2





Figure 3

Figure 4



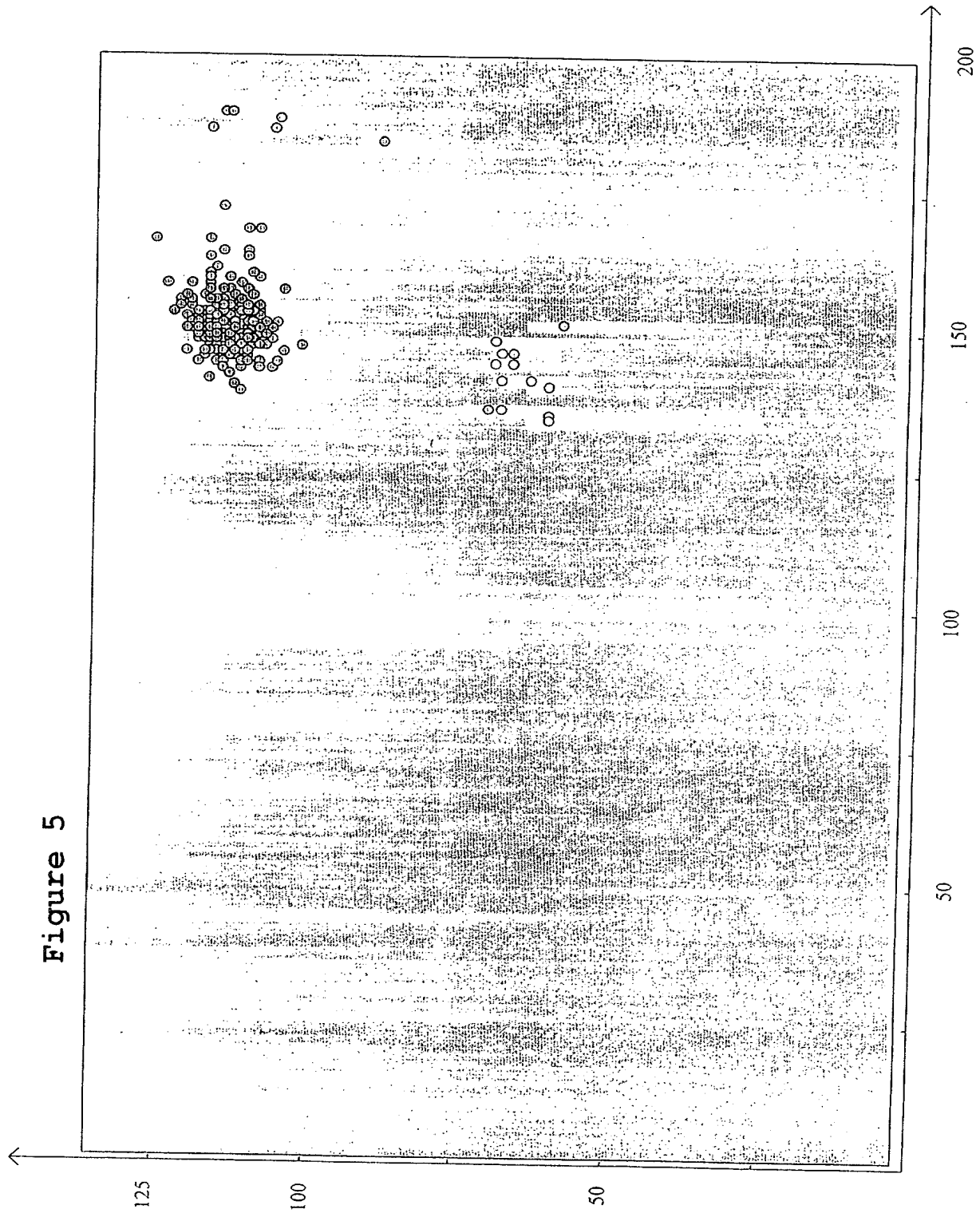
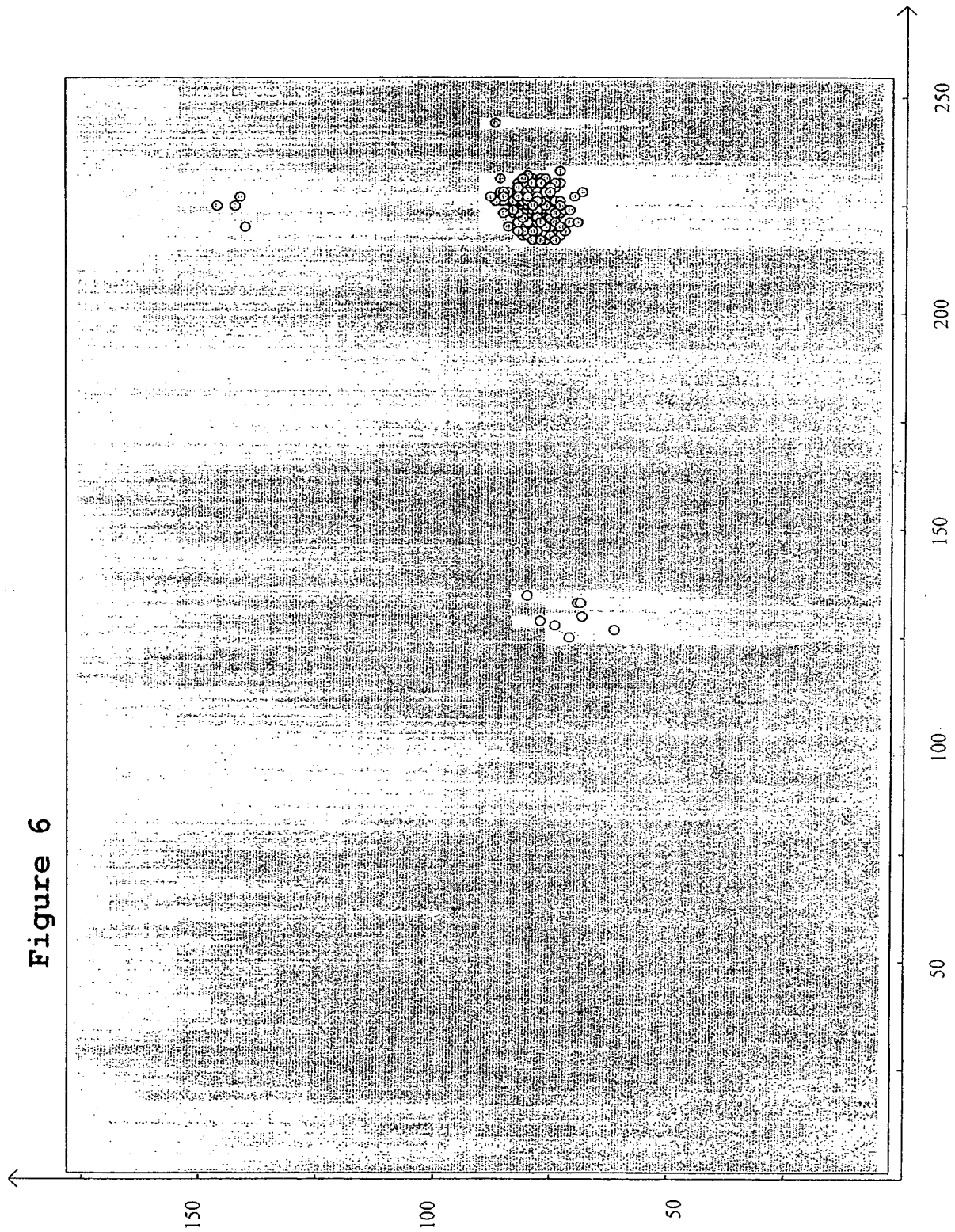


Figure 6



2

15

	Lys	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Gly	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	
				20					25					30			
5	Ser	Asn	Arg	Arg	Thr	Leu	Met	Ile	Met	Ala	Gln	Met	Gly	Arg	Ile	Ser	
			35					40					45				
	Pro	Phe	Ser	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	His	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	
		50					55					60					
10	Glu	Phe	Asp	Gly	Asn	Gln	Phe	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	
	65					70					75					80	
	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	
15					85					90					95		
	Ser	Ala	Thr	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	
				100					105					110			
20	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Met	Met	Gln	Glu	Val	Gly	
			115				120						125				
	Val	Glu	Asp	Thr	Pro	Leu	Met	Asn	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Arg	
		130					135					140					
25	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	
	145					150					155					160	
	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	
30					165					170					175		
	Leu	Ser	Ala	Asn	Leu	Gln	Glu	Arg	Leu	Arg	Arg	Lys	Glu				
				180					185								
35																	
	<210> 3																
	<211> 20																
	<212> ADN																
	<213> Homo sapiens																
40																	
	<400> 3																
	ggtcactcaa tctcaacagc																20
45																	
	<210> 4																
	<211> 20																
	<212> ADN																
	<213> Homo sapiens																
50																	
	<400> 4																
	ggcagaactc aagaagtgtg																20

reçue le 28/05/01



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260999

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BIF022984/FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL			
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveaux polynucléotides et polypeptides de l'IFN alpha 5.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : GenOdyssee			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		ESCARY	
Prénoms		Jean-Louis	
Adresse	Rue	4 rue Moxouris	
	Code postal et ville	78150	LE CHESNAY
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Le 3 mai 2001 Thierry CAEN N°98.0600 RINUY, SANTARELLI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.